

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Juni 2005 (23.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/055877 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61F 2/00

(74) Anwälte: LANGE, Sven usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig
& Schneider, Wallstr. 58/59, 10179 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002761

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Dezember 2004 (13.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 59 830.8 12. Dezember 2003 (12.12.2003) DE
60/544,315 17. Februar 2004 (17.02.2004) US
10 2004 043 449.2
6. September 2004 (06.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): CO.DON AG [DE/DE]; Warthestr. 21, 14513 Teltow
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOSIMOVIC-ALA-
SEVIC, Olivera [DE/DE]; Schwendener Str. 53,
14195 Berlin (DE). LIBERA, Jeanette [DE/DE]; Wil-
helm-Wolff-Str. 25a, 13156 Berlin (DE). SIODLA, Vilma
[DE/DE]; Ernst-Thälmann-Str. 57, 14532 Kleinmachnow
(DE). MEISEL, Hans-Jörg [DE/DE]; Salzachstr. 14,
14163 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF INTERVERTEBRAL DISK CELL TRANSPLANTS AND USE THEREOF
AS TRANSPLANT MATERIAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BANDSCHEIBENZELLTRANSPLANTATEN UND DEREN
ANWENDUNG ALS TRANSPLANTATIONSMATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for the in vitro production of intervertebral disk cartilage cell transplants from patients with diseased intervertebral disk tissue and to the use thereof as transplant material for the treatment of diseased intervertebral disks. The invention also relates to three-dimensional, vital and mechanically stable intervertebral disk cartilage tissue and to the use thereof as transplant material for the treatment of diseased intervertebral disks, and to the testing of active substances. The invention further relates to the operative technique which is used to introduce the transplants, the produced intervertebral disk cell transplants and the produced intervertebral disk cartilage tissue and therapeutical preparations, e.g. injection solutions which contain said tissue and the cell transplants.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplanta-
ten aus erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von
erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles Bandscheibenknor-
pelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben sowie zur Testung
von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die operative Technik zum Einbringen der Transplantate, die herge-
stellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B.
Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.

WO 2005/055877 A2

5

Verfahren zur Herstellung von
10 Bandscheibenzelltransplantaten und deren Anwendung als
Transplantationsmaterial

Beschreibung

15

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro
Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus
erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen
Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von
20 erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin
dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles
Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als
Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten
Bandscheiben sowie zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand
25 der Erfindung sind weiterhin die hergestellten
Bandscheibenzelltransplantate und die
Transplantationstechnik und die hergestellten
Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen,
z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die
30 Zelltransplantate beinhalten.

Die Degeneration der Bandscheiben wird während der Alterung
oder durch Trauma ausgelöst und induziert akute und
chronische Schmerzen und Instabilitäten in der Wirbelsäule.
35 Mehr als 300.000 Patienten in Europa leiden an

5 Bandscheibenerkrankungen. Ungefähr 70 % der Patienten, die
einen Bandscheibenvorfall erleiden und mittels Discectomie
behandelt werden, leiden weiterhin an Rückenschmerzen.
Anhaltende starke Schmerzen machen bei 10 % dieser
Patienten eine weitere operative Behandlung notwendig
10 (Yorimitsu et al, 2001). Grund dafür ist die durch die
Operation bedingte Abnahme der Bandscheibenhöhe, die damit
verbundene Erhöhung der lokalen Belastung des
Bandscheibengewebes (Brinckmann und Grootenboer, 1991) und
vor allem die fehlende Heilung und Regeneration des
15 zerstörten und entfernten Bandscheibengewebes (Lundon und
Bolton, 2001, Meakin et al., 2001). Mit fortschreitender
Zeit resultiert diese Instabilität der betroffenen
Bandscheibe in degenerativen Veränderungen angrenzender
Bandscheiben, wodurch weitere operative Eingriffe und im
20 schlimmsten Fall eine Fusion der Wirbelkörper oder das
Einsetzen einer Prothese notwendig werden. Deshalb ist die
biologische Reparatur bzw. Regeneration der Bandscheibe die
Zukunft für die Behandlung degenerierter Bandscheiben.

25 Eine bekannte Methode zur biologischen Regeneration eines
Gewebes ist die Knorpelzelltransplantation unter Verwendung
von körpereigenen Zellen, die zur Behandlung von
Gelenksknorpeldefekten angewandt wird. Dabei wird das
Potential der Gelenksknorpelzellen genutzt, um *in vivo* nach
30 Transplantation der Zellen neues Gewebe aufzubauen. Dazu
wird dem Patienten eine Gelenksknorpelbiopsie entnommen,
daraus Knorpelzellen isoliert, mittels Zellkultivierung
vermehrt und anschließend dem Patienten im Bereich des
Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert.
35 Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt
vollständig auf. Durch diese Verfahren wird erreicht, dass

5 nach Applikation eines Zelltransplantates im Körper Gewebe
aufgebaut wird. Prinzipiell ist diese Methodik für die
Behandlung der Bandscheibendegeneration nicht anwendbar, da
den Patienten aus ethischen Gründen kein Ausgangsmaterial
aus einer intakten benachbarten Bandscheibe entnommen
10 werden kann und krankes Gewebe a priori nicht verwendbar
ist.

Erste Ansätze zum biologischen Ersatz der Bandscheibe gehen
von der Verwendung von gesundem Bandscheibengewebe aus. So
15 beschreiben Handley (US 6,080,579) und Ferree (US 6,340,369
B1) die Verwendung von normalem Bandscheibengewebe für die
Isolation von Bandscheibenzellen und die Kombination dieser
Zellen mit einem bioresorbierbaren Träger. Auch viele
wissenschaftliche Arbeiten haben die Verwendung von
20 normalem Bandscheibengewebe als Grundlage: Okuma et al.,
2000, Gruber et al., 2000, Chelberg et al., 1995. Jedoch
kann eine gesunde Bandscheibe eines Patienten nicht als
Gewebequelle zur Behandlung einer anderen Bandscheibe
dienen, da die Gewebeentfernung zu einer Zerstörung, zur
25 Degeneration und somit zum Verlust der Funktion dieser
Bandscheibe führt.

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von degeneriertem
Nukleus Pulposus Gewebe, welches aus dem Inneren einer
degenerierten Bandscheibe entfernt und aufgearbeitet wird.
30 Bei diesem operativen Eingriff wird die ohnehin schon
degenerierte und zerstörte Bandscheibe noch weiter
zerstört. Die Aufarbeitung des Gewebes wird dabei zum einen
vorgeschlagen als Dehydrierung (US 6,648,918) oder die
Kombination von darin befindlichen Zellen mit einem
35 Trägermaterial (US 6,569,442; US2001/0020476 A1) und die

5 anschliessende Transplantation zurück in diese
degenerierten Bandscheiben. Allerdings enthält das
dehydrierte Gewebe keine lebenden Zellen und stellt somit
keine Methode der biologischen Regeneration dar. Die
vorgeschlagene Kombination der Nukleus Zellen oder anderer
10 Zellen mit einem Trägermaterial stellt ebenfalls keine
reine biologische Methode dar und bedingt die Verwendung
eines geeigneten Trägermaterials, welches zum Beispiel
biomechanisch geeignet sein muss, welches im selben Masse
wie neues Gewebe aufgebaut werden soll abgebaut wird,
15 welches die Bildung neuen Gewebes nicht behindern darf oder
zum Beispiel keine immunologische Reaktion aufgrund der auf
jeden Fall verwendeten synthetischen, allogenen oder
xenogenen Materialien auslösen darf.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit wäre die Verwendung von
20 Bandscheiben anderer Patienten, wobei es sich somit um eine
allogene Transplantation handelt (6,344,058; Keith DK et
al., 2003). Hierbei stellt jedoch die immunologische
Reaktion ein Problem dar und durch die alleinige
Einbringung einer Spenderbandscheibe wird wahrscheinlich
25 auch keine biologische Regeneration der betroffenen
Bandscheibe ausgelöst.

Aus den genannten Problemen bestehen deshalb für die
Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zur
30 Bandscheiberegeneration die allgemeinen Ziele darin:
medizinisch und ethisch vertretbares Ausgangsgewebe bzw. -
zellprobe zu verwenden, keine anderen oder die betroffene,
erkrankte Bandscheibe des Patienten zu zerstören, nur
patienteneigene Materialien zu verwenden (autologe
35 Therapie), optimale Zellisoliationsbedingungen und -

5 kultivierungsbedingungen zur Vermehrung der Bandscheiben-
 zellkn und anschliessender Bandscheibenmatrixbildung zu
 finden, zur Vermeidung von Immunreaktionen auf Träger-
 materialien zu verzichten. Diese Probleme sind lösbar durch
10 die Transplantation eines speziellen autologen Zelltrans-
 plantates oder durch Transplantation eines außerhalb des
 Körpers vorgefertigten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpel-
 gewebes.

 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb,
15 Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenknorpelzell-
 transplantaten und stabilem vitalen Bandscheibenknorpel-
 gewebe bereitzustellen, die zur autologen Transplantation,
 zum schnellen Wiederaufbau und der Erhaltung der Funktion
 der Bandscheibe geeignet sind. Dabei ist es essentiell,
20 dass das Ausgangsmaterial zur Herstellung der Zelltrans-
 plantate medizinisch und ethisch vertretbar entnommen
 werden kann sowie, dass die autolog kultivierten
 Bandscheibenzellen ihre Eigenschaften über den Zeitraum von
 der Entnahme bis zur Transplantation nicht verändern und
25 eine hohe Proliferations- und Differenzierungskapazität
 aufweisen.

 Überraschend konnte gezeigt werden, dass als
 Ausgangsmaterial erkranktes Bandscheibengewebe verwendet
30 werden kann. Bisher wurde angenommen, dass es nicht möglich
 ist, aus degeneriertem Gewebe, adulte Zellen in
 ausreichender Anzahl zu isolieren, die vital sind,
 ausreichend proliferieren und anschließend auch noch in der
 Lage sind, gewebespezifisch zu differenzieren und
35 Bandscheibengewebe aufzubauen, da in Geweben, die einer

5 Degeneration unterliegen die gewebespezifische Zellen ihre
Eigenschaften im Hinblick auf die Matrixsynthese verändern
und auch absterben und auch durch andere Zellen mit anderen
gewebe-unspezifischen Eigenschaften ersetzt werden.
Überraschenderweise konnte jedoch insbesondere aus
10 vorgefallenem degenerierten Bandscheibengewebe eine
ausreichende Anzahl an vitalen Zellen isoliert werden. Das
vorgefallene degenerierte Bandscheibengewebe besteht aus
Bandscheibenteilen des Anulus Fibrosus und Nucleus
Pulposus, wobei die aus beiden Gewebebereichen isolierten
15 Zellen (Anulus Fibrosus Zellen und Nucleus Pulposus Zellen)
unter den gegebenen autologen Kulturbedingungen dann auch
noch proliferieren und gewebespezifisch besonders
spezifisch differenzieren. Damit sind diese
Gemischzelltransplantate für eine zell-basierte Therapie
20 zur Wiederherstellung der Funktion der Bandscheibe
geeignet.

Es ist somit erstmals ein Verfahren beschrieben, durch
welches besondere autologe Gemisch-Bandscheibenzell-
25 transplantate hergestellt werden können, die nach
Transplantation in eine geschädigte/ erkrankte Bandscheibe
durch den Aufbau neuen Bandscheibengewebes die Erhaltung
der Bandscheibe und damit die Wiederherstellung der
neurologischen und mechanischen Funktion der Wirbelsäule
30 bei einer Bandscheibenerkrankung oder nach einem
Bandscheibenvorfall erlaubt.

Auch bei fortgeschrittener Degeneration der Bandscheibe,
d.h. auch bei Degeneration oder traumatischer Schädigung
35 der äußeren Schicht der Bandscheibe (Anulus Fibrosus), ist

5 durch die vorliegende Erfindung die Wiederherstellung und
Erhaltung der neurologischen, biologischen und mechanischen
Funktion der Bandscheibe ermöglicht, wenn aus
vorgefallenen, degenerierten Bandscheiben Gemisch-
Gewebezellen isoliert werden, die folgend zu einem
10 autologen 3-dimensionalen Gewebe ohne die Verwendung von
Trägermaterialien kultiviert werden. Das isolierte
Bandscheibengewebe, insbesondere die Bandscheibenzellen,
werden bevorzugt unter autologen Kultivierungsbedingungen
nur unter Zusatz von patienteneigenem Serum im
15 Zellkulturmedium vermehrt. Bevorzugt sind die aus dem
degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe isolierten
Bandscheibenzellen während der Vermehrung in einem
Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält
und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und
20 HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei
36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte
von 85-95% kultiviert, wodurch sich ihre Synthese an
Matrix- und Markerproteinen nicht ändert.

25 Bevorzugt ist weiterhin, dass die isolierten
Bandscheibenzellen nach ihrer Vermehrung in Monolayer in
einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz
enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und
HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei
30 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte
von 85-95% kultiviert und dadurch differenzierungsfähig
sind und Matrixstrukturen bilden, die spezifische
Bandscheibenmatrixproteine umfassen.

5 Bevorzugt ist weiterhin, dass die isolierten Bandscheiben-
zellen nach deren Vermehrung in Monolayer in einer Lösung
aus 10 % DMSO, 20 % Serum und 70 % Kulturmedium eingefroren
und wieder aufgetaut werden und so deren Eigenschaften im
Hinblick auf die Synthese von spezifischen Matrixkompo-
10 nenten und Markern nicht verändern und Gewebestrukturen in
vitro und in vivo aufbauen, die aus Bandscheiben-spezifischen
Matrixproteinen bestehen.

Die beschriebenen Merkmale der nicht veränderten Synthese
15 von Marker- und Matrixproteinen stellen keine Aufgabe oder
gewünschte Funktion dar, die erzielt werden soll, sondern
die Folge der Kultivierungsschritte. Die Nennung dieser
Merkmale erfolgt lediglich aus Gründen der Klarstellung.
Mit der Offenbarung dieser Merkmale soll demgemäß
20 klargestellt werden, welche Folgen die erfindungsgemäßen
Verwendungs- oder Verfahrensschritte haben.

Die Bildung der Matrixstrukturen, die spezifische Bandscheibenmatrixproteine umfassen, ist daher keine erstrebenswerte Eigenschaft, sondern die Bildung der genannten
25 Matrixstrukturen ergibt sich aus den Kultivierungsbedingungen.

Bevorzugt werden die die aus dem Bandscheibengewebe
30 isolierten Zellen in einem Kulturgefäß mit hydrophober
Oberfläche und sich verjüngendem Boden kultiviert, wodurch
die dreidimensionalen Zellaggregate erhalten werden.

Bei der Behandlung mit den erfindungsgemäßen
35 Bandscheibenzelltransplantaten ist es vorteilhaft, wenn vor

5 der Transplantation die äußere Hülle der Bandscheibe, der
Anulus Fibrosus, der durch den Austritt des
Bandscheibengewebes geschädigt wurde, in der Art heilt,
dass keine Flüssigkeit, wie die hergestellten
10 Zelltransplantate, aus dem Inneren der Bandscheibe mehr
auslaufen kann. Dieser Zeitraum ist patientenabhängig.
Während dieses Zeitraumes werden die Bandscheibenzell-
transplantate hergestellt, wobei die Gemisch-
Bandscheibenzellen während der Vermehrung in der Zellkultur
ihre gewebe-spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf
15 deren Differenzierungspotential und damit den Erfolg der
Transplantation erhalten. Im Gegensatz dazu wird dieses
Potential bei der getrennten Kultivierung der Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen verringert, wobei nach
Überführung in die 3-dimensionale Umgebung einige
20 Bandscheiben-spezifische Marker nicht exprimiert werden.
Deshalb sind nur die Gemisch-Kulturen besonders geeignet
Bandscheibengewebe nach deren Transplantation in eine
degenerierte Bandscheibe aufzubauen.

25 Außerdem sollen die in vitro hergestellten Zell- und
Gewebetransplantate keine immunologischen Reaktionen im
Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen. Es wurde
überraschender Weise gefunden, dass diese erfindungsgemäß
autolog hergestellten Zellen und Gewebe keine
30 immunologische Reaktionen auslösen.

Das entnommene, patienteneigene erkrankte Bandscheiben-
gewebe kann unterschiedlich weiter bearbeitet werden:

5 (a) Aus den Biopsien werden die Gemisch-Bandscheibenzellen
mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch
Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen
erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen
werden dann nur unter Zusatz von körpereigenem Serum
10 und ohne Zusatz von exogenen wachstumsfördernden
Verbindungen und ohne den Zusatz von Antibiotika und
mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen
kultiviert und so lange vermehrt, bis eine ausreichende
Menge an Zellen zur Verfügung steht (Abb. 2). Diese
15 Zeit wird so kurz wie möglich gehalten, um ihre
phänotypischen Eigenschaften nicht zu verändern. Nach
ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese
geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer
Bandscheibenzell-suspension ist für therapeutische
20 Verwendungen bereitgestellt.

Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen, deren Gewebeanteile
25 im vorgefallenen Bandscheibengewebe enthalten sind,
aufgetrennt und getrennt oder nur als Einzelzellart
kultiviert. Genau unter diesen Gemisch-Bedingungen wird
eine spätere verbesserte Bandscheiben-spezifische
Differenzierung der Zellen erreicht (siehe Abb. 3). Diese
30 autologe Gemisch-Kultiverungstechnik zur Vermehrung der
Bandscheibenzellen ermöglicht somit erstmals eine
Bandscheiben-spezifische Differenzierung dieser so
kultivierten Zellen, nachdem diese in eine 3-dimensionale
Umgebung überführt werden.

5 (b) In einem weiteren Verfahren werden die isolierten Bandscheibenzellen vorkultiviert und ohne Passagierung der Zellen nur kurzzeitig vermehrt. Danach werden die vorkultivierten Zellen geerntet und eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Transplantation tiefgefroren
10 gelagert. Vor der Transplantation werden die Zellen aufgetaut und bis zum Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit autologem Serum und in herkömmlichem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das
15 Zelltransplantat bestehend aus einer Bandscheibenzellsuspension bereitgestellt. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Bandscheibenzellen durch das Einfrieren und Auftauen nicht ihre spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf
20 die Synthese von spezifischen Marker- und Matrixproteinen verlieren (siehe Abb. 5).

(c) In einem weiteren bevorzugten Verfahren wird als Ausgangsmaterial ebenfalls patienteneigenes erkranktes
25 Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die gewebeaufbauenden Zellen aus dem Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert.
30 Diese Gemisch-Zellen werden dann unter autologen Bedingungen und mit üblichem Kulturmedium zunächst in Monolayer kultiviert bis eine ausreichende Zellzahl erreicht ist und anschließend in Zellkulturgefäße mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden
35 überführt und dort so lange in Suspension kultiviert,

5 bis ein dreidimensionales Zellaggregat entsteht, das zu
mindestens 40 Volumen%, vorzugsweise mindestens
60 Volumen% bis maximal 99 Volumen%, extrazelluläre, de
novo synthetisierte Matrix (ECM) beinhaltet, in welche
differenzierte Zellen eingebettet sind. Der Fachmann
10 kann diese Werte durch Entnahme kleinerer Proben
bestimmen. Das entstandene Zellaggregat weist einen
äußeren Bereich auf, in welchem proliferations- und
migrationsfähige Zellen vorhanden sind (siehe Abb. 1).

15 Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen aufgetrennt und
getrennt oder nur als Einzelzellart kultiviert. Genau unter
diesen Gemisch-Bedingungen wird in der 3-dimensionalen
20 Kultur und damit bei der Bildung der 3-dimensionalen
Bandscheibengewebe die Bandscheiben-spezifische Differen-
zierung der Gemischzellen gefördert, wobei die Expression
von Bandscheiben-spezifischen Markern nur in diesen
Kulturen erreicht werden kann und die Bildung der 3-
25 dimensional Bandscheibengewebe bei Verwendung der
Gemischkulturen gefördert ist (siehe Abb. 3). Diese
autologe Gemisch-Kultivierungstechnik ermöglicht somit
erstmal die Herstellung und Verwendung eines Bandscheiben-
spezifischen Gewebetransplantates, welches autolog aus
30 degenerierendem, vorgefallenen Bandscheibengewebe hergestellt
wurde.

Die Gemisch-Bandscheibenzellen, die aus erkranktem
Bandscheibengewebe isoliert werden und aus denen autologe
35 3-dimensionale Bandscheibenzellaggregate hergestellt

5 werden, so dass die entnommenen Zellen in einem de novo synthetisierten Gewebe integriert sind, überleben auch mit fortschreitender Kultivierungsdauer, d. h. die Zellen im Inneren der Aggregate sterben nicht ab. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die
10 Zellen im Inneren der Aggregate aus und es bilden sich Bandscheibenknorpelgewebe, die aus ECM, differenzierten Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen (siehe Abb. 1). Während der Differenzierung in der autologen Zellkultur wird der Abstand der aggregierten Zellen durch
15 Bildung der gewebespezifischen Matrix immer größer (siehe Abb. 3 Vergleich (3c) mit (3d)). Es entsteht im Inneren der in vitro hergestellten Bandscheibengewebe eine Gewebehistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich ist. Während der weiteren Herstellung der Bandscheibenknorpelgewebe bildet sich die "Proliferationszone" am Rand
20 selbiger aus. Diese Zone hat den unschätzbaren Vorteil, dass nach Einbringen der so entstandenen Bandscheibenknorpelgewebe in degenerierte Bandscheiben, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum umliegenden Gewebe herzustellen
25 bzw. eine Integration des in vitro gebildeten Bandscheibenknorpelgewebes in seine Umgebung ermöglichen. Damit sind die hergestellten gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zum Neuaufbau von Bandscheibengewebe *in vivo* geeignet.
30

Aufgrund der biomechanischen Belastung der Bandscheiben direkt nach Behandlung sowie dem Ziel die Bandscheibe in ihrer Höhe gleich mit der Transplantation des Bandscheibenknorpelgewebes wiederherzustellen, kann es von Vorteil
35

5 sein, bereits größere und mechanisch stabile Gewebestücke
zu transplantieren. Für diesen Fall werden mindestens zwei,
besser aber mehr der erhaltenen in vitro Bandscheiben-
knorpelgewebe fusioniert, indem sie gemeinsam unter den
gleichen Bedingungen und in den gleichen Kulturgefäßen wie
10 oben beschrieben bis zur gewünschten Größe weiterkultiviert
werden (siehe auch Abb. 4).

Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als
auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B.
15 Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden.
Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1
eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des
Patienten auf das in vitro hergestellte Gewebe zu
vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autologes Serum des
20 Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder
allogenes Serum zu verwenden.

Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika,
Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich
25 gezeigt, dass nur die autologe oder allogene Kultivierung
der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne
Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste
Proliferation sowie Differenzierung der Zellen in der
Monolayerkultur und eine ungestörte Bildung der spezi-
30 fischen Matrix in den Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin
sind durch den Verzicht von Zusatzstoffen während der
Herstellung nach Einbringen des in vitro hergestellten
Gewebes in den menschlichen und auch tierischen Organismus
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

5 Die Größe der hergestellten Bandscheibengewebe hängt von
der eingebrachten Zellzahl pro Volumen Kulturmedium ab.
Werden beispielsweise 1×10^7 Zellen in 300 μl Kulturmedium
eingebracht, so entstehen innerhalb von 1 Woche dreidi-
mensionale Bandscheibenzellaggregate von ca. 500-700 μm
10 Durchmesser. Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion
der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben
beschrieben - und das Einbringen dieser in die Bandscheibe.
Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen 1×10^4 und
 1×10^7 Zellen in 300 μl Kulturmedium zur Herstellung der
15 kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt
 1×10^5 Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten in vitro
Bandscheibengewebe werden dann für mindestens 2-4 Wochen in
Abhängigkeit von der Zellart und den patientenspezifischen
Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert,
20 um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu
induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne in
vitro Bandscheibengewebe ab ca. einer Woche Kultivierung
fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu
erhöhen.

25 Als Zellkulturgefäße kommen für die erfindungsgemäße
Kultivierung in Suspension bevorzugt solche mit
hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, in
Betracht, wie z. B. Polystyrol oder Teflon. Zellkultur-
gefäße mit nichthydrophober Oberfläche können durch
30 Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden.
Weitere Zusätze sind nicht erforderlich. Vorzugsweise
dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei können für
die Herstellung der kleinen Zellaggregate beispielsweise

5 96-Napfplatten und für die Herstellung der fusionierten
Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die operative Technik zur
Transplantation der Bandscheibenzellen und der in vitro
10 hergestellten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgewebe in
die geschädigte Bandscheibe. Erfindungsgemäß wird die
Transplantation durch Injektion der Bandscheibenzellen
unter fluoroskopischer Kontrolle nach Desinfektion der
Haut, steriler Abdeckung des Hautareals und unter
15 Lokalanästhesie und bevorzugt unbedingt unter Vermeidung
der Verwendung von Kontrastmitteln durchgeführt.

Dazu werden die Bandscheibenzelltransplantate insbesondere
nach deren Herstellung im Labor in speziellen Transport-
20 röhrrchen mit sich verjüngendem Boden, abgerundet oder
spitz, eingefüllt und im Operationsraum mittels einer
Punktionsnadel mit z.B. schrägem Kanülenausgang in eine
Spritze aufgezogen. Vor allem durch den schrägen Boden des
Transportgefäßes und den schrägen Kanülenausgang ist eine
25 vollständige Aufnahme der Zellen enthaltenden Lösung
möglich. Zur Sicherstellung der Abgabe der Zellen in die
Bandscheibe ohne Schädigung der Zellen und mit kleinst-
möglichem Flüssigkeits- und somit Zellverlust hat die
Punktionsnadel im Wesentlichen einen Innendurchmesser von
30 0,4 bis 2 mm. Die Transplantation durch Injektion der
Bandscheibenzellen in die zu behandelnde Bandscheibe
erfolgt nach der hier vorliegenden Erfindung im Speziellen
auf der gegenüberliegenden Seite der zuvor operierten Seite
der Bandscheibe (Bandscheibenvorfallentfernung) mittels
35 einer Punktionsnadel mit schrägem Ausgang. Erfindungsgemäß

5 findet die Injektion des Zelltransplantates unter
fluoroskopischer Kontrolle statt, da die tatsächliche
Abgabe der Zellen in den Bandscheibeninnenraum kontrolliert
werden muss. Herkömmlicherweise können Kontrastmittel
verwendet werden, die jedoch die Zellen schädigen, wodurch
10 der Erfolg der Zelltransplantation verhindert wird. Nach
Abgabe der Bandscheibenzellen in den Bandscheibenraum wird
die Punktionsnadel aus der Bandscheibe heraus gezogen. Für
den Patienten erfolgt bevorzugt eine 12-stündige strikte
Bettruhe, eine folgende 12-24-stündige reguläre Bettruhe
15 und eine 24-48-stündige Bettruhe mit physiotherapeutischen
Übungen. Anschließend erfolgt z.B. für einige Wochen die
Stabilisierung der Wirbelsäule über eine herkömmliche
geeignete Orthese.

20 Die Transplantation der 3-dimensionalen, in vitro
hergestellten Bandscheibenknorpeltransplantate erfolgt wie
für die Bandscheibenzellen insbesondere mittels einer
Punktionsnadel. Zur Sicherstellung der Vermeidung einer
mechanischen und damit biologischen Schädigung der
25 Bandscheibenknorpeltransplantate während der Injektion,
wird eine Punktionsnadel mit einem Durchmesser von
mindestens 500µm verwendet. Weiterhin erfolgt
erfindungsgemäß zur Vermeidung der mechanischen Schädigung
der Bandscheibenknorpeltransplantate im Wesentlichen nur
30 ein einmaliges Passieren durch die Punktionsnadel. Deshalb
werden die Bandscheibenknorpeltransplantate nach deren
Herstellung im Labor bereits in eine Spritze überführt, auf
die dann im Operationssaal nur noch die Punktionsnadel
aufgesetzt wird. Auch hier muss die Punktionsnadel
35 erfindungsgemäß einen schrägen Auslauf aufweisen, um durch

5 die vergrößerte Ausgabefläche ein schnelles Abgeben der Bandscheibenknorpeltransplantate im kleinstmöglichen Flüssigkeitsvolumen (Abgabevolumen) zu ermöglichen. Anschließend erfolgt die Injektion wie oben für die Zelltransplantate beschrieben.

10 Gegenstand der Erfindung sind auch therapeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Bandscheibenzelltransplantate und das Bandscheibenknorpelgewebe umfassen, z.B. Injektionslösungen.

15 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Bandscheibenknorpelgewebe zur Testung von Wirkstoffen, die z. B. die Bildung und Differenzierung von Matrix und Zellen beeinflussen. Dazu werden die Bandscheibenzellaggregate erfindungsgemäß hergestellt und
20 in unterschiedlichen Reifestadien werden die zu testenden Medikamente hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter der in vitro Bandscheibengewebeherstellung und -reifung charakterisiert. Diese Tests sind im Vergleich zu den
25 herkömmlichen Medikamententests an Tieren oder Tumorzellsystemen durch die Verwendung von nur autologem Material patientenspezifisch und ermöglichen eine individuelle Diagnose.

30 Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

35 Beispiel 1: Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten

5

Aus dem erkrankten Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach
10 Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese als Gemischzellpopulationen in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zweimal
15 wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden die Bandscheibenzellen in
20 physiologische Kochsalzlösung überführt und zur Transplantation zur Verfügung gestellt.

In einem in vitro Model konnte das Differenzierungspotential der im Zelltransplantat enthaltenen
25 Bandscheibenzellen aufgezeigt werden. Es werden bandscheibenspezifische Matrixproteine und Markerproteine exprimiert (Abb. 3) und damit eine bandscheibenspezifische Gewebestruktur aufgebaut.

30 Beispiel 2: Transplantation von Bandscheibenknorpelzellen

Die in Beispiel 1 hergestellten Bandscheibenzelltransplantate (mind. 1.000 Zellen, max. 100 Millionen Zellen) vorzugsweise ca. 1 Million
35 Bandscheibenknorpelzellen wurden in physiologischer

5 Kochsalzlösung aufgenommen und in die erkrankte Bandscheibe
eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass in
der behandelten Bandscheibe der Wassergehalt wieder
ansteigt, sowie die Höhe des Zwischenwirbelraumes
aufrechterhalten werden kann, was beides auf die durch die
10 Bandscheibenknorpelzellen synthetisierten Matrixproteine
zurückzuführen ist.

Die erfindungsgemäße in vitro hergestellte
Bandscheibenzelltransplantate werden von den Patienten
15 angenommen, gewährleisten eine schnelle Integration der
proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen sowie
eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die
Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit
erlauben die Bandscheibenzelltransplantate den schnellen
20 Wiederaufbau von Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung
der Patienten und die Wiederherstellung der Band-
scheibenfunktion.

25 Beispiel 3: in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpel-
gewebe

Aus dem vorgefallenen Bandscheibengewebe werden mittels
enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit
Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem
30 Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach
Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe,
werden diese als Gemischkultur in Zellkulturflaschen
überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium
(1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5%
35 CO₂ inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel

5 durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden 1×10^5 Zellen in je ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet
10 ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

15 Den Aufbau der erhaltenen Bandscheibenknorpelgewebe verdeutlicht die mikroskopische Aufnahme in Abb. 1, die den Querschnitt eines erfindungsgemäß hergestellten Bandscheibengewebes mit ECM als Zone verminderter Proliferation und Bildung von gewebespezifischen
20 Matrixproteinen und P als äußere Proliferationszone zeigt.

In diesen *in vitro* Bandscheibengeweben wurde die Expression und Deposition von bandscheibenspezifischen Matrixbestandteilen und regulatorische Proteine wie Aggrecan
25 (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d) und Kollagen Typ III (Abb. 3e) nachgewiesen. Diese sind Bestandteile des nativen Bandscheibenknorpelgewebes *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für
30 die Funktion des Bandscheibenknorpels von entscheidender Bedeutung sind.

Es war überraschend, dass die aus dem erkrankten Bandscheibengewebe isolierten Bandscheibenzellen, wenn
35 diese als Gemisch aus Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus

5 kultiviert werden, eine hohe Proliferationskapazität
(Abb. 2) sowie ein sehr hohes Differenzierungspotential zur
Bildung bandscheibenspezifischer Matrixproteine und
regulatorischer Proteine aufweisen (siehe auch Abb. 3) und
ihre Eigenschaften durch das Prozedere des Einfrierens und
10 Auftauens erhalten werden können (siehe auch Abb. 5).

Beispiel 4: Transplantation von Bandscheibenknorpelgewebe

Das in Beispiel 3 hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe
15 (ca. 10 bis 1000 Gewebestückchen aus je $1 \cdot 10^5$ Zellen)
vorzugsweise 100 Gewebestückchen wurde in physiologischer
Kochsalzlösung bereits im Labor in eine Spritze aufgenommen
und in den Zwischenwirbelraum von erkrankten oder
geschädigten Bandscheiben mittels einer Punktionsnadel mit
20 angeschrägtem Auslauf eingespritzt. Das erfindungsgemäß in
vitro hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe wird von den
Patienten angenommen und gewährleistet neben der Erfüllung
der mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die
schnelle Integration der hergestellten Gewebestücke durch
25 die proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in
der äußeren Schicht der Aggregate sowie eine Regeneration
des Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit
der enthaltenen Zellen. Somit erlaubt die Struktur und
Funktion der Gewebestücke den schnellen Wiederaufbau von
30 Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten
und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

Abb. 4 zeigt fünf fusionierende Bandscheibengewebe. Es ist
zu sehen, dass die Gewebekugeln aneinander haften und
35 sozusagen verschmelzen, die Grenze zwischen zwei

5 Bandscheibengewebe ist nicht mehr zu erkennen. Nach
längerer Kultivierungszeit fusionieren die
Bandscheibengewebe vollständig und es entsteht ein größeres
in vitro Gewebestück. Der Aufbau der so erhaltenen größeren
Zellaggregate ist mit in vitro Bandscheibengewebe
10 vergleichbar. Sie können bis zu maximal 99% ECM beinhalten
und die enthaltenen Zellen sind vital.

5 **Patentansprüche**

1. Verwendung von degeneriertem, vorgefallenem Bandscheibengewebe zur Herstellung eines therapeutischen Mittels zur Behandlung von Bandscheibendefekten.
10
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus dem degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe isolierten Bandscheibenzellen während der Vermehrung in einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert sind.
15
20
3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die isolierten Bandscheibenzellen nach ihrer Vermehrung in Monolayer in einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert und dadurch differenzierungsfähig sind und Matrixstrukturen bilden, die spezifische Bandscheibenmatrixproteine umfassen.
25
30

- 5 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung
in Monolayer in einer Lösung aus 10 % DMSO, 20 % Serum
und 70 % Kulturmedium eingefroren und wieder aufgetaut
10 werden und so deren Eigenschaften im Hinblick auf die
Synthese von spezifischen Matrixkomponenten und Markern
nicht verändern und Gewebestrukturen in vitro und in
vivo aufbauen, die aus Bandscheiben-spezifischen
Matrixproteinen bestehen.
- 15 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die aus dem Bandscheibengewebe isolierten Zellen in
einem Kulturgefäß mit hydrophober Oberfläche und sich
20 verjüngendem Boden kultiviert und so dreidimensionale
Zellaggregate erhalten werden.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltrans-
plantaten,
dadurch gekennzeichnet, dass
aus vorgefallenem degeneriertem Bandscheibengewebe
und/oder erkranktem Bandscheibengewebe,
Bandscheibenzellen isoliert und unter Zusatz von
körpereigenem Serum als dreidimensionalen Aggregate
30 kultiviert und so dreidimensionale
Bandscheibengewebetransplantate erhalten werden..
7. Bandscheibengeweberegenerationsmittel erhältlich
dadurch, dass

- 5 aus degeneriertem Bandscheibengewebe Zellen isoliert,
 kultiviert, geerntet und als Bandscheibenregenerations-
 mittel verwendet werden.
8. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet, dass
 mehrere Gewebe miteinander fusioniert sind.
9. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet, dass
15 das Mittel ein Gemisch aus kultivierten Zellen und dem
 dreidimensionalen Gewebe ist.
10. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 erhältlich dadurch, dass die Bandscheibenzell-
20 transplantate in einem Gefäß mit sich verjüngendem
 Boden und die Bandscheibengewebeaggregate in einer
 Spritze zur Transplantation vorliegen und mittels einer
 Punktionsnadel mit angeschrägtem Auslauf in die zu
 behandelnde Bandscheibe auf der entgegengesetzten Seite
25 der ersten Operation der Bandscheibe durch Injektion
 transplantiert werden.
11. Verwendung der Mittel nach einem der Ansprüche 7 - 10
 zur Testung von Wirkstoffen.
- 30
12. Zelltherapeutische Zubereitungen umfassend
 Bandscheibenregenerationsmittel gemäß einem der
 Ansprüche 7 bis 10.

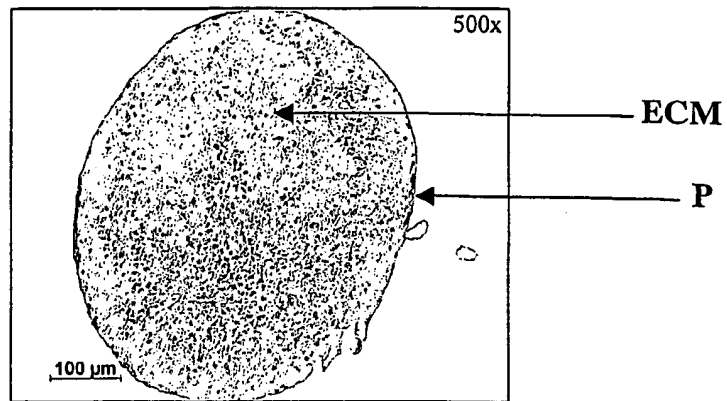


Abb. 1: Histologie von in vitro hergestellten, 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgeweben. Im Inneren der Gewebe befinden sich vitale differenzierte Zellen, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) ausgebildet haben. Am Rand befindet sich eine Proliferationszone (P).

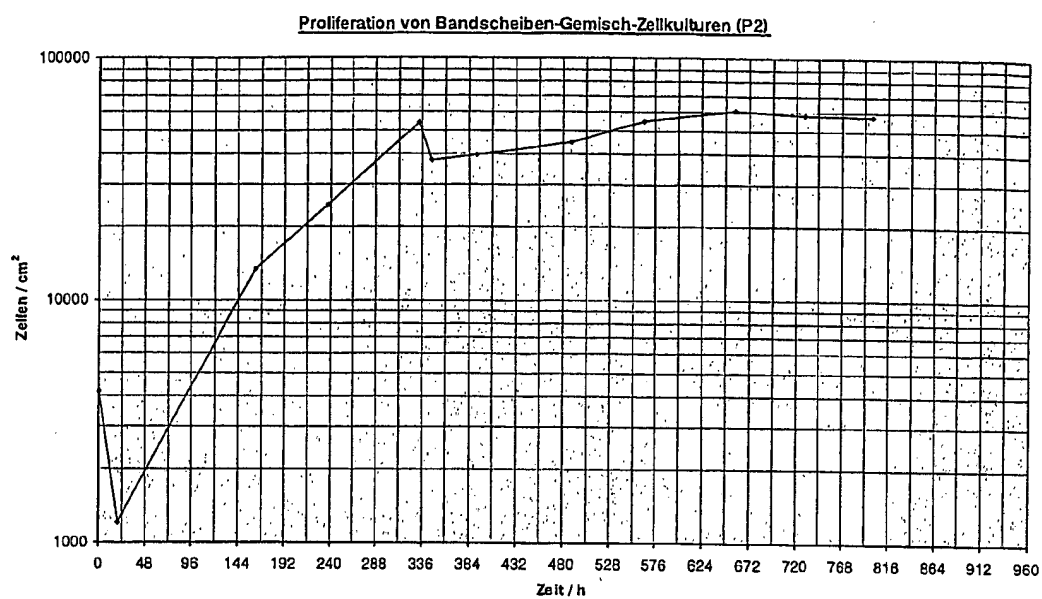


Abb.2: Proliferation von Bandscheibenzellen in Gemisch-Kultur in der Monolayer-Passage 2.

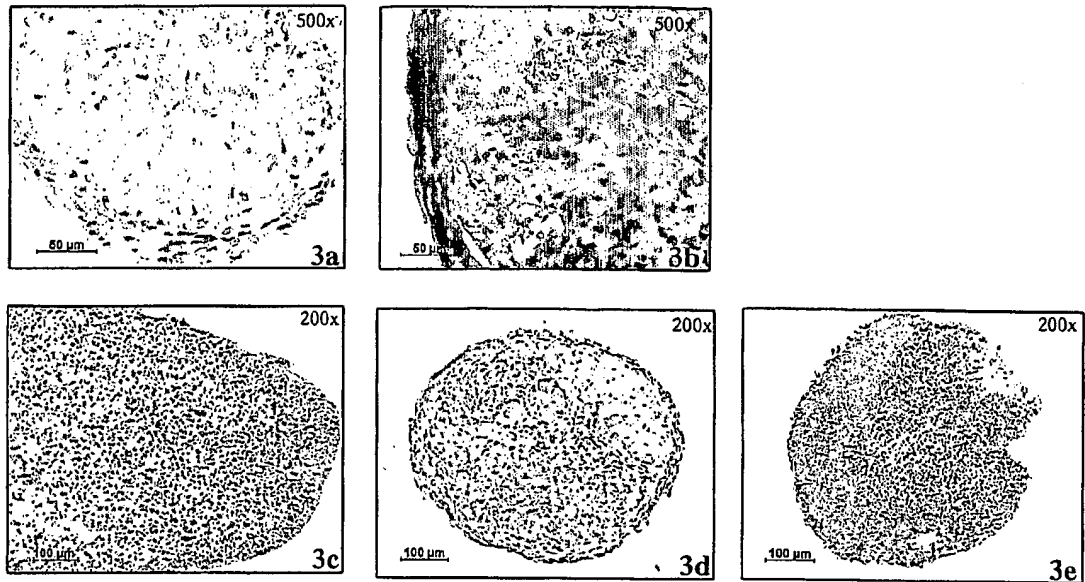


Abb. 3: Expression von Matrixproteinen durch Gemisch-Bandscheibenknorpelzellen nach Vermehrung in Monolayerkultur und anschließender Kultivierung unter 3-dimensionalen Zellkulturbedingungen. (3a) Expression von Aggrekan nach 4 Wochen, (3b) Expression von hyalinspezifischen Proteoglykanen nachgewiesen mittels SafraninO-Färbung nach 4 Wochen, (3c) Expression von Kollagen Typ I nach 2 Wochen, (3d) Expression von Kollagen Typ II nach 4 Wochen, (3e) Expression von Kollagen Typ III nach 4 Wochen.

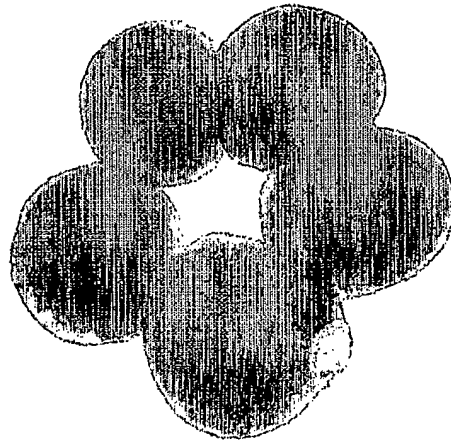


Abb.4: 5 Fusionierende 3-dimensionale Bandscheiben-Knorpelgewebe.

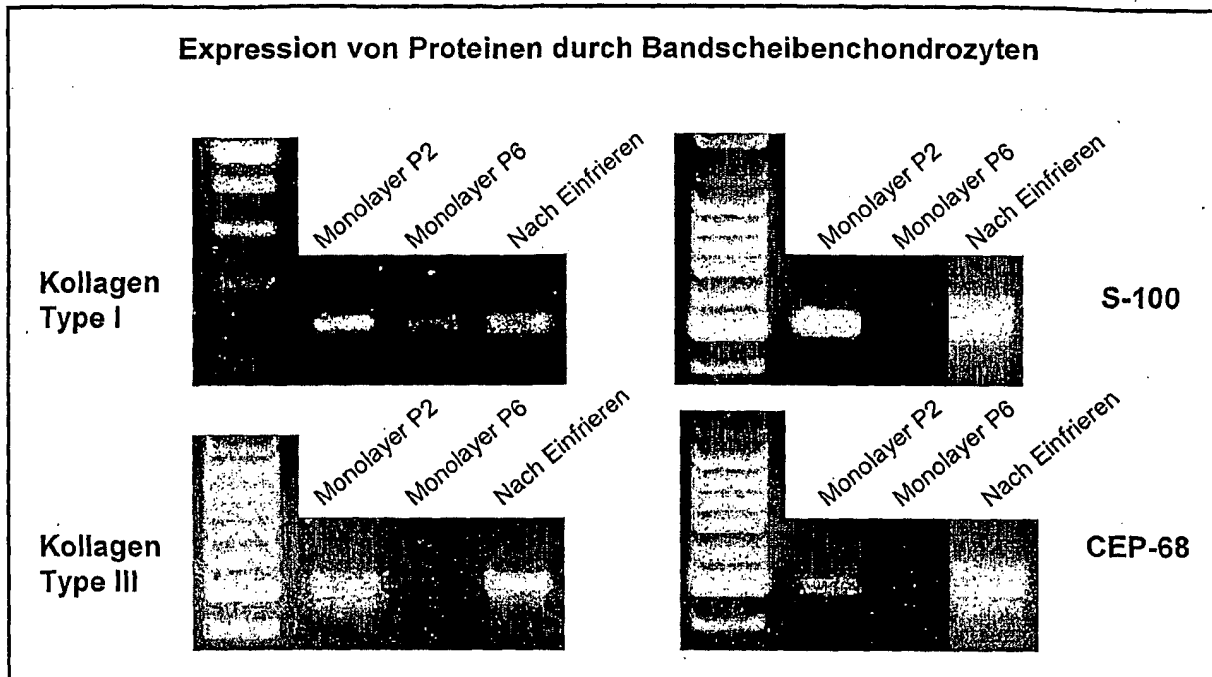


Abb. 5: Expression von verschiedenen Matrixproteinen und regulatorischen Proteinen durch Bandscheibenknorpelzellen, die in Monolayer für verschiedene Passagen kultiviert wurden und nach Einfrieren und Auftauen erneut in Monolayer kultiviert wurden. Monolayer Passage 2 (P2), Monolayer Passage 6 (P6), nach Einfrieren und Auftauen (nach Einfrieren).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.